

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12P 13/04 // C12N 1/20, (C12P 13/04, C12R 1:20) (C12N 1/20, C12R 1:20)		A1	(11) 国際公開番号 WO96/31616
			(43) 国際公開日 1996年10月10日 (10.10.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00913			(74) 代理人 弁理士 中村 稔, 外(NAKAMURA, Minoru et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル646号 Tokyo, (JP)
(22) 国際出願日 1996年4月3日 (03.04.96)			
(30) 優先権データ 特願平7/81626 1995年4月7日 (07.04.95) JP			(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) メリシャン株式会社(MERCIAN CORPORATION)[JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋1丁目5番8号 Tokyo, (JP)			
中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 仲田邦穂(NAKATA, Kuniho)[JP/JP] 〒251 神奈川県藤沢市立石1-8-10 Kanagawa, (JP)			
成田隆夫(NARITA, Takao)[JP/JP] 〒251 神奈川県藤沢市羽鳥3-13-1 204号 Kanagawa, (JP)			
恒川 博(TUNEKAWA, Hiroshi)[JP/JP] 〒251 神奈川県藤沢市羽鳥3-13-1 401号 Kanagawa, (JP)			
吉岡武男(YOSHIOKA, Takeo)[JP/JP] 〒252 神奈川県綾瀬市上土棚南3-3-3-3102 Kanagawa, (JP)			
(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING L-2-AMINOADIPIC ACID			
(54) 発明の名称 L-2-アミノアジピン酸の製造方法			
(57) Abstract			
<p>A process for producing L-2-amino adipic acid, which comprises converting the aminomethyl group of L-lysine into a carboxyl group by using a culture of a microorganism of the genus <i>Flavobacterium</i>. This process permits L-2-amino adipic acid to be directly produced from L-lysine in a high yield, thus being useful as a microbial process suitable for mass production.</p>			

添付公開書類

国際調査報告書

(57) 要約

L-リジンのアミノメチル基を、フラボバクテリウム属に属する微生物の培養物を用いてカルボキシル基に変換することを含むL-2-アミノアジピン酸の製造方法。この製造方法によりL-リジンから直接L-2-アミノアジピン酸を高収率で得ることができる。この製造方法は大量製法として有効な微生物的方法である。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルベニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LK	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EES	エストニア	LS	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	レソトニア	SDE	スエーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GAB	ガボン	LV	ルクセンブルグ	SEG	シンガポール
BB	バルバドス	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SII	スロヴェニア
BE	ベルギー	GEN	グルジア	MC	モナコ	SK	スロ伐キア
BF	ブルガリア・ファソ	GEN	ギニア	MD	モルドバ共和国	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GKR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スウェーデン
BJ	ベナン	HUE	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BR	ブラジル	IHEU	アイルランド	ML	マリア共和国	TG	トジドスタン
BY	ベラルーシ	IST	イスラエル	MN	モンゴル	TJ	トジキスタン
CA	カナダ	IT	アイスランド	MR	モーリタニア	TM	トルコメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	JP	イタリア	MW	マラウイ	TR	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	KE	日本	MX	メキシコ	TT	トライニティ
CH	スイス	KGG	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KGP	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KKP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CN	中国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
CU	キューバ	KZ	カザフスタン			VN	ヴィエトナム
CZ	チェコ共和国						

L-2-アミノアジピン酸の製造方法

技術分野

本発明は、微生物を利用したL-2-アミノアジピン酸の製造方法に関する。L-2-アミノアジピン酸は、非蛋白性のアミノ酸であり、抗リウマチ剤、乾癬治療剤及び制癌剤として有用なメトトレキセート誘導体（WO92/09436）等の医薬品製造の中間体として重要である。また、ペプチド性抗生物質やペプチドホルモンなどの生理活性ペプチドの末端修飾剤として用いることができ、ペニシリンやセファロスボリンに代表される β -ラクタム系抗生物質の発酵生産において前駆体としても利用できる。

発明の背景

L-2-アミノアジピン酸は、細菌である*Cholera vibrio*、トウモロコシをはじめとする植物体、カエルの胚など、生物界に広く見いだされている。また、真菌類などにおいてはリジン生合成の中間体として、また、 β -ラクタム系抗生物質の生合成においては前駆体としての位置を占めている。その化学合成による製造は光学分割や多段階反応を必要とすることから、コスト的に有効な手段とはなっていない。微生物による生産としては、アルカリゲネス、シュードモナス、クルチアに属する微生物を用いて、L-ビペコリン酸から製造する方法（特開平1-98495号公報）が知られ、また、アグロバクテリウム、クレブシエラ、アルカリゲネス、プレビバクテリウム、バチルスに属する微生物を用いて、L-リジンから製造する方法（特開平6-181787号公報）が知られている。しかし、前者では原料であるL-ビペコリン酸が高価であること、後者では反応効率が一般に低く、大量製法としての問題を残している。

発明の開示

本発明は、L-リジンから直接L-2-アミノアジピン酸を高収率で得ること

ができ、大量製法として用いられる微生物的方法を提供することを目的とする。

本発明は、微生物としてリジンの α -アミノ基を変化させることなく、アミノメチル基を酸化によりカルボキシル基に変えることができる特定の属の微生物を利用することによりL-リジンから直接的かつ効率的にL-2-アミノジピン酸を得ることができるとの知見に基づいてなされたものである。

すなわち、本発明は、L-リジンのアミノメチル基を、ラボバクテリウム属の微生物の培養物を用いてカルボキシル基に変換することを特徴とするL-2-アミノジピン酸の製造方法を提供する。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により製造されるL-2-アミノジピン酸は、下記式1：



で表わされ、本発明の方法にはその塩を製造する場合も含まれる。

塩としては、酢酸、酒石酸などの有機酸塩、塩酸、硫酸等の無機酸塩、トリエチルアミン、N-メチルモルホリンなどの有機塩基塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの無機塩基塩があげられる。

本発明で使用するラボバクテリウム属の微生物としては、リジンのアミノメチル基を酸化によりカルボキシル基に変え、リジンから直接L-2-アミノジピン酸を製造できる能力がある限り、ラボバクテリウム属の微生物の任意の株を用いることができる。好ましい一例として、土壤より採取したラボバクテリウム属の細菌No. 7-1株を挙げることができる。このNo. 7-1株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（住所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に*Flavobacterium* sp. 7-1として寄託されている（受託番号FERM BP-5457：寄託日 1995年1月17日）。

このNo. 7-1株は、菌体の幅が $0.5 \mu\text{m}$ 、長さが $2 \mu\text{m}$ のグラム染色陰性の好気性桿菌で、内生胞子は生じず、カタラーゼ、オキシダーゼ、フォスファターゼ陽性で、黄色色素を分泌した。鞭毛は持たず運動性がなかった。これらの生理的性質から、バージェイズマニュアルオブシステムチックバクテリオロジーにもとづきラボバクテリウム属と同定した。

上記、微生物を培養する培地は、特に限定されず、通常の微生物の培養に用いられるものであればよく、

例えば、炭素源としては、上記微生物の利用可能なものであればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フルクトース、シュクロース、デキストリンなどの糖類、グリセロール、ソルビトールなどの糖アルコール、フマル酸、クエン酸等の有機酸を使用でき、これらの炭素源の培地への添加量は、通常、0.1～10重量%（以下、%と略称する）程度とすることが望ましい。

窒素源としては、例えば、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸アンモニウム塩やフマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸アンモニウム塩ないし、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカー、カゼイン加水分解物等の天然窒素源を使用でき、これらの窒素源の培地への添加量は、通常、0.1～10%程度とすることが望ましい。

又、無機塩類としては、例えば、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム等のリン酸アルカリ金属や塩化カリウム、塩化ナトリウム、等の塩化アルカリ金属、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄等の硫酸金属塩を使用でき、これらの無機塩類の培地への添加量は、通常、0.001～1%程度とすることが望ましい。

これらのうち、通常の細菌用の増殖培地を用いた液体培養が好ましく、炭素源としてはグルコース、マルトース、澱粉などが、窒素源としては硫酸アンモニウム、ペプトン、酵母エキス、大豆粉などが特に有効である。その他に、無機塩としてリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、食塩などが通常用いられる。

微生物の培養は、上記の培地で20～40℃、好ましくは28～37℃でpHは5～9、好ましくは6～8で好気的条件下で実施すればよい。

本発明に利用できる微生物の培養物としては、その微生物の全培養液、菌体、培養濾液およびそれらの処理物があげられる。菌体の処理物としては、乾燥菌体やアセトン、トルエン、メタノール等の有機溶媒で処理した菌体、菌体抽出物、固定化処理物等をあげることができる。また、培養濾液の処理物としては、その培養液の濃縮物、乾燥粉末があげられる。更に、その培養菌体および培養濾液より酵素を分離精製して用いることもできる。

本発明を実施するには、培地に微生物を接種した後、例えば、20～40℃で

12～120時間培養することにより、微生物を1ml中に 10^6 ～ 10^{10} 個含む菌株培養液を得、その培養液に原料化合物であるL-リジンを通常、最終濃度が0.5～3.0mg/mlになるように水または補助溶剤に溶解して加えるか、または溶解せずにそのまま添加し、通常、20～40℃で18時間～7日、好ましくは18時間～5日反応させ、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂等を用いた各種イオン交換クロマトグラフィー、HPLCなどの吸着クロマトグラフィー、溶媒や温度を利用しての沈殿化や結晶化等の通常の精製手段によりL-2-アミノアジビン酸を得ることができる。

添加するL-リジンの形状及び添加時期については特に制限されるものではないが、溶解性などの点から一塩酸塩として用いるのが好ましく、培養開始時の添加でもよく培養途中1～5日目にも添加してもよい。

本発明によれば、抗リウマチ剤、乾癬治療剤および制癌剤として有用なメトトレキセート誘導体(WO92/09436)の合成における有用中間体であるL-2-アミノアジビン酸を、L-リジン又はその塩から簡単な操作により、直接かつ効率良く製造することができる。

次に本発明を実施例によって説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

Brain Heart Infusion 3.7%の組成の液体培地30mlをいれた300mlフラスコを滅菌し、L-リジン-塩酸塩20%液(水酸化ナトリウムでpHを8.0に調整)を1/10量添加した。No. 7-1株をスラントより植菌し、28℃、220rpmで96時間振とう培養した。遠心により上清液を得、以下に示す液体クロマトグラフィー及び薄層クロマトグラフィーにより、上清液中に含まれるL-2-アミノアジビン酸を定量した結果、5.0g/1のL-2-アミノアジビン酸が生産されていることがわかった。

液体クロマトグラフィー法

カラム: Shim-pack ISC-07/S 1504

移動相: A液 0.2Nクエン酸ナトリウム(pH3.2) 7%エタノール

B液 0.6Nクエン酸ナトリウム(pH10.0)

C液 0.2N水酸化ナトリウム

グラジェント溶出

流量: 0.3 ml/min

温度: 55°C

検出器: 蛍光検出器 (Ex 348 nm, Em 460 nm)

反応試薬: a液 0.04% 次亜塩素酸ナトリウム

炭酸-ほう酸緩衝液

b液 0.08% o-フタルアルデヒド

0.1% N-アセチルシステイン

炭酸-ほう酸緩衝液

反応試薬流量: a液、b液 各0.2 ml/min

薄層クロマトグラフィー法

薄層: メルク社シリカゲル薄層 1.05715

展開液: n-ブタノール:酢酸:水 = 3:1:1

発色: ニンヒドリン

得られた2-アミノアジピン酸について、L型体が100%であることを以下の液体クロマトグラフィー分析で確認した。

カラム: ダイセル化学CR (+)

移動相: 過塩素酸水溶液 pH 2.0

検出: 示差屈折計

実施例 2

150 mlのマルトース3%、バクトペプトン1%、酵母エキス0.5%、リン酸2カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.05%、食塩0.8% (pH 6.8) の培地を含む500 mlフラスコを滅菌し、No. 7-1株を植え、28°C、220 rpmで24時間振とう培養した。このフラスコ培養液を15リットルの同培地を含む30リットルのジャーファーメンターに添加した。但しジャーパー培地には、300 gのL-リジン塩酸塩と消泡剤であるアデカノール(旭電化工業(株) 製) 0.75 gを加えた。通気、攪拌を行い5日間培養したところ90 gのL-2-ア

ミノアジピン酸が生成した。

培養液をパーライト添加後濾過し、ロータリーエバボレイターにより1/10液量に濃縮し塩酸でpHを3.2とし4°Cに冷却した。得られた沈殿を濾過により得て、2%となるようにイオン交換水に溶かし、アンモニアでpHを10とした。陰イオン交換樹脂IRA-402 (AcO⁻型) 7.9リットルを用いて吸着、水で洗浄後、0.5N酢酸で分画溶出した。濃縮後4°Cに冷却し、得られた結晶を乾燥した。その結果、82gのL-2-アミノアジピン酸の白色粉末を得た。

請求の範囲

1. L-リジンのアミノメチル基を、フラボバクテリウム属に属する微生物の培養物を用いてカルボキシル基に変換することを特徴とするL-2-アミノアジピン酸の製造方法。
2. フラボバクテリウム属に属する微生物が*Flavobacterium* sp 7-1株 (FERM BP-5457)である請求項1記載の製造方法。
3. フラボバクテリウム属に属する微生物の培養物に、L-リジンを添加して20~40℃で18時間~7日培養し、得られたL-2-アミノアジピン酸を単離する請求項1記載の製造方法。
4. フラボバクテリウム属に属する微生物の培養物が、液体培地にフラボバクテリウム属に属する微生物を接種した後、20~40℃で12~120時間培養したものである請求項3記載の製造方法。
5. L-リジンを濃度が0.5~30mg/mlになるように添加する請求項3記載の製造方法。
6. L-リジンを添加した後、pH 5~9、好気的条件下で培養を行う請求項3記載の製造方法。
7. フラボバクテリウム属に属する微生物を液体培地に接種して20~40℃で12~120時間培養し、次いでL-リジンを添加して20~40℃で18時間~7日、pH 5~9、好気的条件下で培養した後、得られたL-2-アミノアジピン酸を単離することを特徴とするL-2-アミノアジピン酸の製造方法。
8. フラボバクテリウム属に属する微生物が*Flavobacterium* sp 7-1株 (FERM BP-5457)である請求項7記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int. Cl⁶ C12P13/04 // C12N1/20, (C12P13/04, C12R1:20),
 (C12N1/20, C12R1:20)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P13/00-C12P13/24, C12N1/20-C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-181787, A (Bior Inc.), July 5, 1994 (05. 07. 94), Claim, lines 7 to 39, column 2 (Family: none)	1 - 8
A	JP, 1-98495, A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), April 17, 1989 (17. 04. 89), Claim (Family: none)	1 - 8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search June 25, 1996 (25. 06. 96)	Date of mailing of the international search report July 9, 1996 (09. 07. 96)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/00913

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. 6C12P13/04// C12N1/20, (C12P13/04, C12R1:20),
(C12N1/20, C12R1:20)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. 6

C12P13/00-C12P13/24, C12N1/20-C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P. 6-181787, A, (バイオール株式会社), 5. 7月. 1994 (05. 07. 94), 特許請求の範囲, 第2欄第7行-39行, (ファミリーなし)	1-8
A	J P. 1-98495, A, (工業技術院長), 17. 4月. 1989 (17. 04. 89), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
25. 06. 96

国際調査報告の発送日

09.07.96

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)
植野 浩志

印

4 B 2121

電話番号 03-3581-1101 内線 3449